

Teresa Łaska
Zofia Chirek-Kępczyńska
Katarzyna Falkenberg
Henryk Urbanek

Katedra Fizjologii
i Biochemii Roślin
Uniwersytet Łódzki
Łódź

Wytwarzanie pochodnych szikoniny w hodowli korzeni, kalusów i zawiesin komórkowych *Lithospermum arvense* i *Alkanna tinctoria*

1. Wstęp

Substancje z grupy szikoniny posiadające antibakteryjną aktywność są stosowane jako barwniki oraz w kosmetyce i przy leczeniu ran i oparzeń. Otrzymywane są one głównie z korzeni *Lithospermum erythrorhizon* oraz od szeregu lat również z hodowli kalusów i zawiesin komórkowych tej rośliny (1,2,3). Królikowska i Świątek wykryli obecność pochodnych szikoniny w korzeniach rosnącego w Polsce *Lithospermum arvense* (4). Barwniki szikoninowe o właściwościach antibakteryjnych otrzymano również z *Alkanna tinctoria*, rośliny z rodziny *Boraginaceae*, podobnie jak z *Lithospermum sp.* (5).

Celem pracy było otrzymanie hodowli korzeni, kalusów i zawiesin komórkowych *L. arvense* i *A. tinctoria* oraz zbadanie ich zdolności do wytwarzania barwników – pochodnych szikoniny.

2. Materiały i metody

Do badań jako materiału użyto korzeni, tkanki kalusowej i zawiesiny komórkowej *Lithospermum arvense* oraz *Alkanna tinctoria*. Korzenie *A. tinctoria* uzyskano w hodowli *in vitro* z kalusa rosnącego na agarowym podłożu B-5 (6) z dodatkiem 2 mg/l kwasu indolilo-3-octowego i 0,1 mg/l kinetyny. Korzenie przybyszowe tworzące się u nasady liści *L. arvense* na podłożu B-5 wykorzystano jako materiał wyjściowy do ich hodowli. Odcięte korzenie umieszczano w płynnym podłożu B-5 z dodatkiem kwasu indolilo-3-maslowego (IBA) w ilości 2 mg/l. Hodowlę prowadzono na wytrząsarce. Po 4 tygodniach oznaczano biomasę i zawartość barwników szikoninowych. Kalus otrzymano z pędów *L. arvense* i *A. tinctoria*, stosując podłoże B-5 zawierające jako regulatory wzrostu 6-benzyloaminopurynę (BAP) i IAA odpowiednio w ilości 0,2 i 1 mg/l. Na tym podłożu nagromadzano również biomasę kalusa prowadząc hodowlę na skosach agarowych. W celu otrzymania barwników tkankę kalusową przenoszono na zmodyfikowane, agarowe podłoże B-5 (tab. 1). Zawartość barwników szikoninowych określano w tkance kalusowej po trzech tygodniach hodowli. Dla zawiesiny komórkowej jako podłoże produkcyjne stosowano pożywkę M-9 wg Y. Fujita (2) ze zwiększoną ilością fosforu i z dodatkiem 0, 2 mg/l IAA i 2 mg/l kinetyny (tab. 1). Zawiesiny hodowano w kolbach o pojemności 250 ml, zawierających 30 ml pożywki. Do każdej kolby wprowadzano 2,5 g świeżej, rozdrobnionej masy kalusa. Hodowlę kontynuowano na wytrząsarkach rotacyjnych; zawartość barwnika oznaczano po 8 dniach. Wszystkie hodowle prowadzono w ciemności w temp. 25°C.

W celu oznaczenia zawartości barwników szikoninowych biomasę korzeni kalusa i zawiesin komórkowych po oddzieleniu od podłoża zalewano metanolem i poddawano homogenizacji przez 5 min. Następnie komórki umieszczano w temp. -10°C na 24 godz. Tak przygotowany materiał ponownie wirowano przez 20 min przy 4000 obrotów na min. Zebrany supernatant odparowywano do sucha na wyparce próżniowej w temperaturze 40°C. Osad rozpuszczano

Tabela 1

Skład pożywek do produkcji barwników szikoninowych

| Składniki | B ₅ -zmodyfikowana (mg/l) | M-9 (mg/l) |
|---|---|---------------|
| NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O | 40 | 40 |
| KNO ₃ | 1500 | 80 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | — | — |
| MgSO ₄ × 7H ₂ O | 250 | 750 |
| Na ₂ SO ₄ | — | 1480 |
| Ca(NO ₃) ₂ × 4H ₂ O | — | 694 |
| KCl | — | 65 |
| FeNaEDTA | 43 | 1,8 |
| CaCl ₂ | 115 | — |
| MnSO ₄ × H ₂ O | 10 | — |
| H ₃ BO ₃ | 3 | 4,5 |
| ZnSO ₄ × 7H ₂ O | 2 | 3 |
| CuSO ₄ × 5H ₂ O | 0,8 | 0,8 |
| CoCl ₂ × 6H ₂ O | 0,025 | — |
| Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O | 0,250 | — |
| KJ | 0,75 | — |
| Myo-inositol | 100 | — |
| IAA | 0,2 | 0,2 |
| BAP | 2 | — |
| Kinetyna | — | 2 |
| Agar | 7,5 g | — |
| Sacharoza | 20 g | 30 g |

ph pożywki – 5,6 – przed autoklawowaniem

w 1 ml chloroformu. Zawartość barwników oznaczano wg metody Mizukami (7). Pobierano 0,1 ml chloroformowego ekstraktu i odparowywano do sucha. Do pozostałości dodawano 5 ml 2,5% KOH i wytrząsano 10 min. Absorbancję mierzono przy długości fali 622 nm. Szikoninę stosowano jako wzorzec.

W celu identyfikacji barwników szikoninowych prowadzono rozdział za pomocą TLC. Stosowano płytki DC-Alufolien Kieselgel 60 (MERCK), używając do rozwijania chloroform oraz mieszaninę chloroform:benzen, 1:1. Równocześnie prowadzono rozdział następujących substancji wzorcowych: acetyloszikoniny (AS), szikoniny (S), β,β -dwumetylo-akrylo-szikoniny (DMAS), β -hydroksyzowaleryloszikoniny (HIVS), alkaniny (A). Przybliżony skład procentowy barwników w badanym materiale określano na podstawie pomiaru powierzchni szczytów uzyskanych po odczycie densytometrycznym chromatogramów. Za 100% przyjęto całkowitą zawartość wszystkich pochodnych szikoninowych.

Substancje wzorcowe pochodnych szikoniny otrzymano od T. Morimoto z Mitsui Petrochemical Industries w Yamaguchi-Ken.

3. Wyniki i dyskusja

Najlepsze wyniki w hodowli sterylnej korzeni uzyskano, gdy otrzymano je z kalusa *A. tinctoria* i z liści *L. arvense*. Po 3 tygodniach hodowli na podłożu B-5 w obecności IBA 2 mg/l biomasa w obydwu przypadkach zwiększała się ponad 5-krotnie. Zawartość natomiast barwników szikoninowych wynosiła 2,12% w stosunku do suchej masy w korzeniach *A. tinctoria* i 0,93% w korzeniach *L. arvense* (tab. 2). Zarówno dla otrzymania barwników z zawiesiny komórkowej, jak i z kalusa, namnażano biomasę na agarowym podłożu B-5 z dodatkiem IAA i BAP w ilości odpowiednio 1 i 0,2 mg/l. Na podłożu tym po 3 tygodniach wzrostu biomasa zwiększała się ponad 12-krotnie, ale tkanka nie wykazywała czerwonego zabarwienia. Przeniesienie tkanki kalusowej na agarowe podłoże B-5 z zawartością IAA i BAP w ilości odpowiednio 0,2 i 2 mg/l powodowało intensywne zabarwienie tkanki na czerwono przy znacznie powolniejszym namnażaniu biomasy, 2-3 krotnie w ciągu trzech tygodni. Zawartość barwników szikoninowych wynosiła po tym czasie 3,25% suchej masy w kalusie *A. tinctoria* i 0,78% suchej masy w kalusie *L. arvense*. W hodowli zawiesin komórkowych uzyskiwano większą wydajność barwników, gdy do płynnego podłoża produkcyjnego wprowadzano rozdrobnioną tkankę kalusową ze skosów agarowych niż biomasę komórkową namnażaną uprzednio w hodowli wgłębnej. Po 8 dniach hodowli zawartość barwników wynosiła 1,38% suchej masy w zawieszynie komórkowej *A. tinctoria* i 0,70% suchej masy w zawieszynie komórkowej *L. arvense*. Wydaje się intrygujące, że nie uzyskiwano większej wydajności tych związków w kalusach i zawieszinach komórkowych otrzymanych z korzeni zamiast z pędów badanych roślin.

Tabela 2

Zawartość barwników szikoninowych w korzeniach, kalusach i zawieszinach komórkowych *L. arvense* i *A. tinctoria*

| Materiał | Zawartość barwników w mg/g suchej masy | |
|-----------|--|---------------------|
| | <i>L. arvense</i> | <i>A. tinctoria</i> |
| korzeń | 9,3 | 21,2 |
| kalus | 7,8 | 32,5 |
| zawiesina | 7,0 | 13,8 |

Tabela 3

Przybliżony skład procentowy barwników szikoninowych w korzeniach, kalusach i zawieszinach komórkowych *L. arvense* i *A. tinctoria*

| Barwnik | <i>L. arvense</i> | | | <i>A. tinctoria</i> | | |
|---------|-------------------|-------|-----------|---------------------|-------|-----------|
| | korzeń | kalus | zawiesina | korzeń | kalus | zawiesina |
| DMAS | 60 | 60 | 25 | 65 | 55 | 30 |
| AS | 25 | 10 | 45 | 35 | 45 | 70 |
| S | 0 | 10 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| HIVS | 15 | 20 | 15 | 0 | 0 | 0 |

Szybkość namnażania biomasy w stosowanych w pracy warunkach była podobna dla obu roślin. Wykorzystanie tkanek kalusowych i zawiesin komórkowych do otrzymywania barwników szikoninowych może być bardziej korzystne niż korzeni, ze względu na szybsze namnażanie biomasy. W *L. arvense* zidentyfikowano cztery barwniki szikoninowe: DMAS, AS, HIVS, S

(tab. 3). Występowały one zarówno w korzeniach jak i w kalusie oraz w zawiesinie. Nie wykryto jedynie szikoniny w korzeniach. Zarówno w korzeniach jak i w kalusie wykryto największe ilości DMAS, a w zawiesinie AS. W *A. tinctoria* stwierdzono obecność dwóch barwników DMAS i AS. Analogicznie jak u *L. arvense* wykryto największe ilości DMAS w korzeniach i w kalusie, a w zawiesinie było ponad dwukrotnie więcej AS niż DMAS. Podobnie w zawiesinie komórkowej *Lithospermum erythrorhizon* wg Fujita i wsp. (8) w największych ilościach wytwarzana była AS, natomiast szikonina tylko w śladowych. Nie wykryto obecności alkaniny ani u *A. tinctoria* ani u *L. arvense*.

Literatura

1. Fujita Y., Hara Y., Ogino T., Suga C., (1981), Plant Cell Reports, 1, 59–60.
2. Fujita Y., Hara Y., Suga C., Morimoto T., (1981), Plant Cell Reports, 1, 61–63.
3. Hara Y., Morimoto T., Fujita Y., (1987), Plant Cell Reports, 6, 8–11.
4. Królikowska M., Świątek L., (1966), Dissertationes Pharmaceuticae et Pharmacologicae, AM, Łódź, XVIII, 2, 157–168.
5. Papageorgiou V. P., Winkler A., Sagredos A. N., Digenis G. A., (1979), Planta Medica, 35, 56–60.
6. Gamburg O. L., Miller R. A., Ojima K., (1968), Exp. Cell Res., 50, 151–158.
7. Mizukami H., Konoshima M., Tabata Y., (1977), Phytochemistry, 16, 1183–1186.
8. Fujita Y., Madea Y., Suga C., Morimoto T., (1983), Plant Cell Reports, 2, 192–193.

Production of shikonin derivatives by root, callus and suspension cultures of *Lithospermum arvense* and *Alkanna tinctoria*

Summary

Root, callus and suspension cultures of *L. arvense* and *A. tinctoria* were obtained. All the above mentioned cultures were able to produce shikonin derivatives. The qualitative composition of the shikonin derivatives in callus and suspension cultures was similar to that of root culture, but it differed quantitatively. Total content of shikonin compounds under the same culture conditions was higher in *A. tinctoria* than in *L. arvense*.

Adres dla korespondencji:

Henryk Urbanek, Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki,
ul. Banacha 12/16, 90–237 Łódź.

APARATURA NAUKOWA I SPRZĘT LABORATORYJNY



K + B niemieckie przedsiębiorstwo handlowe zaopatruje w sprzęt i aparaturę laboratoryjną za pośrednictwem swego Oddziału w Polsce:

dr Janina Zawielak

ul. Topolowa 5, Jelonek k. Poznania, 62002 Suchy Las

tel (061) 234650 fax (061) 234650

Kühn + Bayer Polska

W naszym katalogu oferujemy ponad 40 000 pozycji: od szkła laboratoryjnego do specjalistycznej aparatury naukowej z blisko 100 firm całego świata!

Naszym klientom oferujemy:

- Dostawę sprzętu po cenach producenta (bez doliczania marży!).
- Bezpłatny transport do granicy polskiej.
- Kompetentną konsultację i informację handlową.
- Pomoc w załatwianiu formalności płatniczych i celnych.
- Postępowanie reklamacyjne w ramach gwarancji.

Dostarczamy sprzęt m.in. następujących firm:

Büchi, Desaga, Eppendorf, Falcon, Fritsch, Hamilton, Hecht Heto, Hettich, Ingold, Fischer Scientific, Kautex, Köttermann, Leybold Heraeus, Maches & Nagel, Memmert, Mettler, Miele, Nalgene, Original Hanau, Sartorius, Seral, Schleicher & Schüll, Schott, Wittmann—Heraeus, Will Wetzlar, Zeiss.

